

***Nemzeti Onkológiai Kutatás-Fejlesztési Konzorcium
a daganatos halálozás csökkentésére***

1/48/2001

Zárójelentés: 2001. május 15.-2004. december 31.

**RP2. Nem-invazív szűrési és prognosztikai modellek
kifejlesztése és gyakorlati alkalmazása a vastag- és
végbélrákok halálozási gyakoriságának
csökkentésére**

Dr. Ottó Szabolcs
Országos Onkológiai Intézet

RP2. Nem-invazív szűrési és prognosztikai modellek kifejlesztése és gyakorlati alkalmazása a vastag- és végbélrákok halálozási gyakoriságának csökkentésére

Témavezető: dr. Ottó Szabolcs, Országos Onkológiai Intézet

- 1. Anti-lactoferrin, anti-casein alkalmazása vastagbél tumorok szűrésére**
- 2. Vastagbél tumorok szűrése tejfehérjék alkalmazásával**
- 3. Exfoliált sejtek genetikai azonosítása**
- 4. Vastagbél daganatos genetikai szűrés**
- 5. Keringő daganatsejtek azonosítása és jellemzése.**
- 6. Vastagbél prognosztikai markerek vizsgálata és értékelése.**

*

1. Új immunkémiai eljárások alkalmazása a vastagbél daganatok szűrésére

A colorectális daganatok a daganathalálozási statisztikában a férfiaknál a második, míg a nőknél az emlőrákkal felváltva az első, illetve második helyet foglalják el. A colorectális daganatok az össz daganatos megbetegedések 10-11%-át képezik, amely alapján ezen daganatok kezelése népegészségügyi problémát jelent. A vastagbél daganatok 20-25 év alatt rákelőző állapotban keresztül alakulnak ki. Az idejekorán felfedezett daganat, illetve vastagbél polip eltávolításával a daganat gyógyítható. A vastagbél daganatok szűrését ezért a Johan Béla Népegészségügyi Program kiemelten támogatja és minden 50 év feletti nő és férfi részére ajánlja a szűrésben való részvételt. A szűrés a bélvérzés kimutatására alapozódik, amelyről azonban bebizonyosodott, hogy nem eléggé daganat specifikus. Az Országos Onkológiai Intézet Központi Laboratóriumában olyan új immunkémiai módszert dolgoztak ki, amely segítségével a vastagbél daganatok jelenléte nagyobb biztonsággal, nagyobb gyakorisággal mutatható ki. Az új szűrési eljárás lényege az anti-hemoglobin és anti-albumin szérumszint együttes alkalmazása a széklet minták vizsgálatára. A kettős immunkémiai fehérje kimutatás alapján 30%-kal több vastagbél volt azonosítható, mint a bélvérzés kimutatásán alapuló módszerrel. Az eljárás szabadalmi bejelentése megtörtént. Az új kettős immunkémiai szűrési módszer alkalmazásától a vastagbél daganatok hatékonyabb szűrése és ezáltal a betegek gyógyulási esélyének javulása várható.

A szűrési eredményeink alapján az anti-humán haemoglobin + albumin immunszérumszint termékünket az Országos Laboratóriumi Intézet új orvosi laboratóriumi diagnosztikai reagensként nyilvántartásba vette (OLI: OI-76429/2003).

2. Exfoliált sejtek genetikai azonosítása

A vastagbél daganatok korai felkutatására olyan nem invazív szűrő módszereket keresnek, amely összefügg a daganat biológiai, genetikai sajátosságával. Ennek megfelelően specificitása, szenzitivitása eléri vagy meghaladja a bélvérzésre alapozó szűréseket. A vastagbél daganatból lesodródó sejtek a széklettel ürülnek, ezen exfoliált sejtekből izolált DNS genetikai analízise alkalmas lehet a vastagbél daganatok azonosítására.

A mások által publikált adatok és saját vizsgálataink alapján is bebizonyosodott, hogy a leggyakoribb genetikai változás az APC gén inaktiválása (mutáció, allel vesztés, metiláció), illetve a K-ras gén mutáció megjelenése.

A K-ras mutációk gyakoriságát (54%) az **APC inaktiválás** mértéke meghaladja, amely irodalmi adatok szerint a vastagbél daganatok 70%-ában manifesztálódik. További vizsgálataink ennek megfelelően arra irányultak, hogy az **APC gén szomatikus változásait a Magyarországon előforduló sporadikus vastagbél daganatos betegekben meghatároztuk.**

Ennek érdekében az APC gén teljes kódoló részét lefedő PCR termékek heteroduplex analízisével azonosítottuk a mutációkat. A primer daganatokon végzett vizsgálatok alapján sikerült feltérképezni a sporadikus vastagbél daganatokban előforduló APC inaktiválás teljes spektrumát. A primer daganatokban a mutációk 66%-ban, míg az exfoliált sejtekből nyert DNS minták 62%-ban detektálhatók. Az APC mutációk közel azonos előfordulása a primer daganatokban és az exfoliált sejtekben (4% különbség) azt jelzi, hogy az APC mutáció heteroduplex analízise alkalmas az exfoliált vastagbél daganat sejtek azonosítására.

3. Vastagbél daganatok genetikai szűrése

Örökletes, nonpolyposis vastagbél daganatos betegek genetikai vizsgálatata:

24, a Bethesda kritériumok szerint HNPCC típusú vastagbél daganatos beteget vizsgáltunk. A genomialis DNS-t alvadásgátolt vérből izoláltuk (Wizard Genomic DNA Purification Kit, Promega A1120).

A hMLH1 és hMSH2 összes exonját (35) lefedő primer párokkal végzett PCR reakció termékeit először SSCP, illetve heteroduplex analízissel vizsgáltuk (BioRad vertikális gélapparátus, MDE gél CAMBEX 506209) majd a normáltól eltérő mintázatot adó termékeket sense és antisense irányban szekvenáltuk (PE Applied Biosystems: BigDye Terminator Cycle Sequencing kit v.3.1; ABI-PRISM 310 Genetic Analyser).

A mutációk azonosításához a következő internetes adatbázisokat használtuk: ICG-HNPCC Database (<http://www.nfdht.nl/database.htm>), The Human Gene Mutation Database, Cardiff (<http://archive.uwcm.ac.uk/uwcm/mg/hgmd0.html>), InSiGHT Database (<http://www.insight-group.org>)

Jelentős eredménynek számít, hogy 2 HNPCC-s betegen dupla mutációt találtunk:

A hMSH2 3-as exonban: cd127 Asn→Ser és a hMSH2 7-es exonban: cd422 Glu→STOP az egyik beteg esetén (7.), valamint a hMLH1 19-es exonban: cd716 Val→Met és a hMSH2 13-as exon-intron határon: 2210+1G→C a másik beteg (25.) esetén. Ez utóbbi beteg két különálló vastagbél daganattal rendelkezett. A két beteg hozzátartozóinak bevonásával családfa vizsgálatot végeztünk a mutációk patogenetikai szerepének meghatározásához.

1 esetben találtunk mutációt a hMLH1 2-es exonban: cd48 Gln→Pro (6.). Ezt a mutációt elsőként azonosítottuk

9 esetben találtunk polimorfizmust a hMSH2 1-es intronban: 211+9: C→G, 2 esetben polimorfizmust a hMSH2 6-os exonban: cd 322 Gly→Asp, 1 esetben polimorfizmust a hMSH2 9-es intronban: 65092 A→T, valamint 1 esetben hMLH1 polimorfizmust a hMLH1 14-es intronban: 50677 A→G

Családvizsgálat:

A 7. és 25. beteg családtagjait célzottan vizsgáltuk a bennük előforduló mutációkra.

Az 1. családban a hMSH2 127-es kodon missense mutációja konzervatív aminosavcsere (Asn→Ser) eredményez, melyet korábban már leírtak, és önmagában nem patogén polimorfizmusként valószínűsítene (Samowitz et al, Gastroenterology 121:830- (2001). Önmagában ezt az elváltozást hordozó családtagok nem betegek. A 422-es kodon nonsense

mutációját elsőként azonosítottuk.. A beteg családtagok mind hordozzák ezt a mutációt. Ez a tény a korai lánctermináció miatti funkciókiesést, illetve a mutáció patogén szerepét igazolja.

A 2. családban előforduló genetikai elváltozások közül a a hMLH1 716-os kodonjának missense mutációjának szerepe eddig nem tisztázott (P.Hutter et al, Int J Cancer 78:680-4(1998). A hMSH2 13-as exon-intron határán lévő nukleotidcsere alternatív splice site-ot eredményez, amely out of frame delécióhoz vezethet (Kurzawski et al. J Med Genet 39: e65 (2002). Minthogy az egyik, illetve másik mutációt önmagában hordozó családtagok egészségesek, feltételezzük, hogy a kettős mutáció együttes jelenléte vezet patogén elváltozáshoz.

4. Vastagbél daganatok prognosztikai faktorainak vizsgálata

A vastagbél daganatok kialakulása paradigmája annak, hogy az egymást követő genetikai károsodások hogyan vezetnek a daganat kialakulásához.

Bebizonyosodott, hogy a sporadikus vastagbél daganatok kialakulása besorolható 2 alternatív genetikai útvonalba. A genotipizálás alapja a microsatellita instabilitás (MSI) jelenléte vagy hiánya, metilációs mintázat jellegzetessége, aneuploidia jelenléte vagy hiánya, APC, K-ras, p53 mutációk jelenléte.

Vizsgálatainkban ennek megfelelően meghatároztuk a vastagbél daganatok: 1. MSI státusát, 2. hMLH, p16, APC, DAPK, MGMT promoter régiók metiláltságát, 3. metilációban résztvevő enzimek polimorfizmusát (MTHFR C677, A1298, MS2756), 4. APC, p53, K-ras mutációk azonosítása.

A vizsgálatasorozat alapvető célkitűzése az volt, hogy a fenti markerek alapján a vastagbél daganatokat tipizáljuk. Összefüggést kerestünk a klinikai stádium (Dukes'B, Dukes'C) a daganat lokalizációja (proximális, distalis), valamint a jelzett változások gyakorisága között.

4.1. Vastagbél daganatok jellemzése microsatellita instabilitás alapján

Vizsgálatainkban 37 MSI-L és MSI-S vastagbél daganat metiláció és mutációs analízisét végeztük el. Megállapítottuk, hogy a vizsgált esetek 35%-a az MSI-L, míg 65% az MSI-S altípusba tartozik. Vizsgálatainkban a hMLH1 gén 9., 14., 17. exonjaiban mutattunk ki polimorfizmust. A 14. exonban észlelt polimorfizmust a mi munkacsoportunk azonosította először. a hMSH2 gén 13 exonjaiban észlelt polimorfizmust is elsőként írjuk le. Az általunk azonosított, MMR géneket érintő új polimorfizmusok feltehetőleg csak a magyar populációra jellemzőek, funkcionális jelentőségük további vizsgálatot igényel.

4.2. Metilációs status meghatározása vastagbél daganatokban

A daganatok kialakulásához a gén mutációk mellett az ún. Epigenetikus szabályzó mechanizmusok megváltozása is hozzájárul. A gén expresszió epigenetikus szabályozásában a gén promoter régiójának metilezettsége döntő szerepet játszik. Ennek megfelelően meghatároztuk a sejtproliferációban (p16) a DNS repairben (hMLH1, MGMT) és a metasztázis kialakulásában (DAPK, APC) résztvevő gének metilációs státusát.

Összefüggést kerestünk a vastagbél daganatok MSI statusa, gén metilációs mintázata, valamint a gén mutációk (APC, p53, K-ras) gyakorisága között. Említésre méltó, hogy a primer tumor metilációs mintázata megegyezik a keringő daganat sejtek, valamint a szérumból izolált DNS metilációs státusával.

4.3. MTHFR, MS gén polimorfizmus vizsgálata vastagbél daganatokban

Vizsgálataink alapvető célkitűzése a metilációban szerepet játszó metylen tetrahydrofolate reduktáz (MTHFR) és methionin synthase (MS) génpolimorfizmusok meghatározása azzal a céllal, hogy összefüggést keressünk a vastagbél daganatok metilációs statusa és ezen gének jellegzetes polimorfizmusa között.

Az MTHFR 677 TT mutáns genotípus a kontroll populációban nagyobb gyakorisággal fordul elő (21,8%). Daganatokban TT genotípus gyakorisága 13,5%-ra csökken. Ennek alapján ezen polimorfizmus jelenléte védettséget szolgáltat a vastagbél daganatok kifejlődésére. Vizsgálataink elősegíthetik a vastagbél daganat kialakulására fokozottan érzékeny egyének azonosítását és ezáltal útmutatással szolgálhatnak a kemoprevencióra alkalmas személyek azonosítására.

A proximális és distalis daganatok eltérő microsatellita statusa és eltérő MTHFR polimorfizmusa alapján prognózisuk és terápiás érzékenységük is eltérő.

Vizsgálati eredményeink alapján a vastagbél daganatok prognózisához, terápiás érzékenységük predikciójára az MSI státus, metilációs státus és MTHFR polimorfizmus meghatározása fontos információt szolgáltat.

Az elvégzett munkából megjelent publikációk:

Beczássy E., Ottó Sz., Vámosi Nagy I.: A tumormarkerek szerepe a vastag- és végbélrákos betegek követésében és ellenőrzésében. Magyar Onkológia 48, 57-62, 2004

E. Kámory, O. Kolacsek, Sz. Ottó and O. Csuka: hMLH1 and hMSH2 somatic inactivation mechanisms in sporadic colorectal cancer patients. Pathol Oncol Res, 9, 236-241, 2003

Sz. Németh M., Ottó Sz.: Két antigént felismerő immunszérum előállítás és vizsgálata a rejtett bélvérzés immunkémiai kimutatásához. Magyar Onkológia 48, 45-48, 2004

Sz. Ottó and L. Döbrössy: Screening for colorectal cancer with immunological FOBT. Br J Cancer 90, 1871-1872, 2004

Ottó Sz: A vastag- és végbéldaganatok szűrésének epidemiológiai háttere. In: A vastagbélrák megelőzése és kezelése (szerk: Tulassay Zsolt), 21-30, 2004.

Szentirmay Z. Csuka O: A vastagbélrák molekuláris pathológiája. In: A vastagbélrák megelőzése és kezelése (szerk: Tulassay Zsolt), 31-62, 2004.

P. Rozen, M. Pignone, M. Crespi, D. Criblez, S.A. El-Badawy, R. Leicester, Sz. Otto, C. Pox, M. Richards, D. Smith, S. Spann, G. P. Young and R. Smith: Workgroup V: Professional education and advocacy. Ann Oncol 16: 42-45, 2005